

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

30.4.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2003年 5月19日

出願番号
Application Number: 特願2003-139773
[ST. 10/C]: [JP 2003-139773]

REC'D 01 JUL 2004	
WIPO	PCT

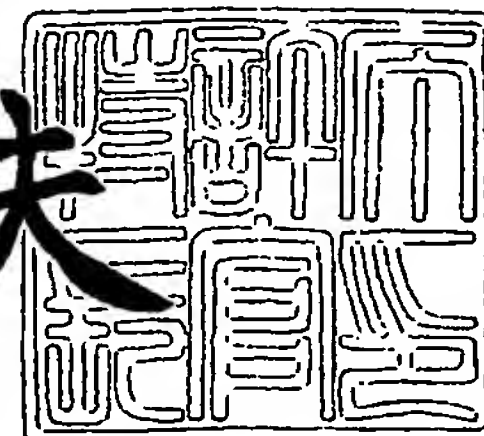
出願人
Applicant(s): 独立行政法人 科学技術振興機構

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 6月11日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 PS03-1295

【あて先】 特許庁長官殿

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都江東区潮見 2 - 8 - 1 4 - 1 0 1 4

 【氏名】 安田 賢二

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都三鷹市新川 6 - 2 2 - 2 0 東京大学三鷹国際学
 生宿舍 D 棟 2 0 2

 【氏名】 高橋 一憲

【特許出願人】

 【識別番号】 396020800

 【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【代理人】

 【識別番号】 100087631

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 滝田 清暉

【選任した代理人】

 【識別番号】 100110249

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 下田 昭

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 011017

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 図面 1

 【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 細胞培養用マイクロチャンバー

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 細胞培養領域、該領域と外部とを連結する少なくとも 2 つの流路、該流路の開閉手段、並びに該細胞培養領域及び流路の開閉を光学的に観察する手段から成る細胞培養用マイクロチャンバーであって、一の流路が細胞培養領域に細胞を含んでもよい培養液を注入することができる流路であり、他の一の流路が細胞培養領域から細胞を含んでもよい培養液を排出することができる流路であり、該流路の少なくとも一部が弾性材料により囲まれて成り、該開閉手段が該流路を外部から前記観察手段の観察方向に対してほぼ直角方向に押す又は引くことにより該流路を開閉又はその幅を変更するものであることを特徴とする細胞培養用マイクロチャンバー。

【請求項 2】 前記開閉手段を作動させていない時の、前記流路の幅が対象となる細胞サイズと同程度である請求項 1 に記載の細胞培養用マイクロチャンバー。

【請求項 3】 前記開閉手段が前記流路に隣接する空隙を有し、該空隙が気体又は液体で満たされ、その圧を変更することにより、該空隙の大きさを変更し、その結果、該流路を開閉又はその幅を変更するものである請求項 1 又は 2 に記載の細胞培養用マイクロチャンバー。

【請求項 4】 前記弾性材料がシリコン系樹脂である請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の細胞培養用マイクロチャンバー。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

この発明は、細胞培養用のマイクロチャンバーに関し、より詳細には、細胞の状態を顕微鏡観察しながら 1 細胞単位で培養することのできる細胞培養用のマイクロチャンバーに関する。

【0002】

【従来の技術】

従来、細胞の状態の変化や、細胞の薬物等に対する応答を観察するのに、細胞集団の値の平均値をあたかも一細胞の特性であるかの様に観察してきた。しかし、実際には細胞は集団の中で細胞周期が同調しているものはまれであり、各々の細胞が異なった周期でタンパク質を発現している。

これらの問題を解決するべく、同調培養等の手法が開発されているが、培養された細胞の由来が全く同一の一細胞からではないことから、培養前の由来細胞各々の遺伝子の違いがタンパク質発現の違いを生み出す可能性があり、実際に刺激に対する応答の結果を解析するときに、そのゆらぎが細胞の反応機構自体が普遍的に持つ応答のゆらぎに由来するものなのか、細胞の違い（すなわち遺伝情報の違い）に由来するゆらぎなのか明らかにすることは難しかった。

【 0 0 0 3 】

また、同様の理由から、細胞株についても、一般には完全に一細胞から培養したものではないため、刺激に対する応答の再現性が細胞各々の遺伝子の違いによってゆらぐものか明らかにするのは難しかった。

更にまた、細胞に対する刺激（シグナル）は、細胞周辺の溶液に含まれるシグナル物質、栄養、溶存気体の量によって与えられるものと、他の細胞との物理的接触によるものの2種類があることから、ゆらぎについての判断が難しいのが実情であった。

【 0 0 0 4 】

一方、従来より、バイオテクノロジーの研究分野において細胞の観察を行う場合には、大型培養器にて培養された細胞群の一部を一時的に培養器から取り出して顕微鏡にセットし、観察を行うか、あるいは、顕微鏡全体をプラスチックの容器で囲い温度を管理し、その中に小さい別の容器を用い二酸化炭素濃度、及び湿度を管理しつつ、顕微鏡観察を行っていた。このとき、細胞を培養しながら、古くなった培養液と新鮮な培養液を交換することで溶液条件を一定にすることが工夫されてきている。

たとえば、循環ポンプを用いて、基材表面に対する培地のレベルを基材の上端縁高さより高いレベルと下端縁高さより低いレベルとの間で上げ・下げ操作することにより、上記低レベルに下がると培地を供給し、上記高レベルに上がると培

地を排出する機構によって栄養状態を一定に保つことができる（特許文献 1）。

また、培養容器内に、新たな培地を培養容器に導入する導入管と、培養容器の培地を外部に排出する排出管と、培養容器の気体部分とポンプとを連通する気管の各一端を挿入し、前記導入管、排出管及び気管の夫々の管路に培養容内への菌の侵入を阻止するフィルターを設けることにより、培養槽の栄養状態を一定に保つことができる（特許文献 2）。

【 0 0 0 5 】

しかし、培養細胞の溶液環境と、細胞間の物理的接触を制御しながら培養することができなかった。

そこで、本発明者らは、これらの問題点を解決し、新たに特定の一細胞のみを選択し、その一細胞を細胞株として培養する技術、及び細胞を観察する場合に、細胞の溶液環境条件を制御し、かつ、容器中での細胞濃度を一定に制御する技術、あるいは相互作用する細胞を特定しながら培養観察する技術を出願した（特許文献 3）。

【 0 0 0 6 】

【特許文献 1】

特開平 1 0 - 1 9 1 9 6 1

【特許文献 2】

特開平 8 - 1 7 2 9 5 6

【特許文献 3】

特開 2 0 0 2 - 1 5 3 2 6 0

【 0 0 0 7 】

【発明が解決しようとする課題】

しかし、上記特許文献 3 で用いた光ピンセット技術は、捕獲できる力の大きさがピコニュートン程度であり、これは浮遊する細胞を捕獲する力としては十分であるが、自ら泳動する細胞を捕獲するには不十分であった。また、培養中の泳動細胞を選択的に培養部から回収することは困難であった。

そこで、本発明者らは、上記のマイクロチャンバーについて更なる検討を加え、培養中にマイクロチャンバーの形状を可逆に変化させることで、マイクロチャ

ンバー内の泳動細胞を選択的に回収できる流路を開閉することのできる新しいマイクロチャンバーを提供する。

【0 0 0 8】

【課題を解決するための手段】

即ち、本発明は、細胞培養領域、該領域と外部とを連結する少なくとも2つの流路、該流路の開閉手段、並びに該細胞培養領域及び流路の開閉を光学的に観察する手段から成る細胞培養用マイクロチャンバーであって、一の流路が細胞培養領域に細胞を含んでもよい培養液を注入することができる流路であり、他の一の流路が細胞培養領域から細胞を含んでもよい培養液を排出することができる流路であり、該流路の少なくとも一部が弾性材料により囲まれて成り、該開閉手段が該流路を外部から前記観察手段の観察方向に対してほぼ直角方向に押す又は引くことにより該流路を開閉又はその幅を変更するものであることを特徴とする細胞培養用マイクロチャンバーである。

【0 0 0 9】

この光学的観察手段として、光学的顕微鏡、ビデオ録画装置、カメラなどが挙げられ、これらはパソコン等に繋いで画像処理を行うものであってもよい。また、観察を容易にするため、光照射装置を共に用いてもよい。

この開閉手段を作動させていない時の、前記流路の幅が対象となる細胞サイズと同程度であることが好ましい。従って、適当な流路の幅は、対象となる細胞のサイズによって異なる。また、開閉手段を作動させていない時の、流路の幅を、対象となる細胞のサイズより若干狭くしておく、細胞が通常状態ではこの流路を通過せず、流路を開けたときのみ通過するようになるため、細胞の分離に適する。

開閉手段は、流路に外部から力を加えて、流路を開閉又はその幅を変更させるものであればよい。機械的に力を加えるものや、空隙を設けてその体積を変化させるもの等いかなるものであってもよい。

また、前記開閉手段が前記流路に隣接する空隙を有し、該空隙が気体又は液体で満たされ、その圧を変更することにより、該空隙の大きさを変更し、その結果該流路開閉又はその幅を変更するものであることが好ましい。この空隙を空気で

満たし、この空隙を空気溜として、その空気圧で流路の開閉を制御することが最も簡便である。

【0010】

流路は、その全部を弾性材料で囲まれるようにしてもよいし、その開閉手段側のみを弾性材料で作ってもよい。上記の空隙の周りとその流路の回りとを同じ材料で作し、その空隙の大きさの変化が直ちに流路の幅に影響するようにこれらを配置することが好ましい。

この弾性材料は、いかなる弾性材料であってよく、細胞培養に悪影響の無い合成高分子を用いるのが簡便であり、特に、シリコン系樹脂であることが好ましい。

また、この細胞培養用マイクロチャンバーの細胞培養領域と流路の開閉を光学的に観察するため、必要な部分のみ透明材料で作ることが好ましい。全体を透明弾性材料で作ってもよい。

【0011】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の細胞培養用マイクロチャンバーを詳細に説明するが、本発明の細胞培養用マイクロチャンバーはこれらに限定されるものではない。

まず、本発明の細胞培養マイクロチャンバーの基本構成の一例を図1に示す。図1aの(B-B)水平断面図及び、図1bの(A-A)縦断面図に例示するように、本発明の細胞培養マイクロチャンバー100は、スライドガラス等の光学的に透明な基板112上に、光学的に可視領域で透明かつ弾性の高分子中に形成された細胞培養領域110と、その両端に位置する流路108、109、111の開閉状況を膨張又は収縮によって調節する空気溜105、106と、この空気溜へ加圧又は減圧を行うための空気の通路103、104と、空気圧制御部との接続ジョイント101、102が配置されており、溶液（細胞を含む培養液）は流れ107の方向に連続的に流れることができる。

【0012】

図1に示すように、培養領域110は、2つの流路108、109の開放又は閉鎖状況によって、その中で培養している細胞を捕獲することも、排出すること

も可能である。ここで、流路の開閉は、空気溜の空気の圧力を制御することで、流路を囲む高分子壁面を膨張又は収縮させ、流路 1 1 1 の幅を調節する。このとき、流路の幅を光学的計測手段によって計測できるよう、流路を、光学顕微鏡の光軸とは垂直な、水平面上に平面的に配置している。これによって、たとえば光学顕微鏡を用いることで、流路の幅、すなわち開放状況を実際に試料を流さなくても観察するだけで確認することができる。従って、この開放状況を目視で確認しながら、空気溜 1 0 5、1 0 6 の空気圧を調整することが可能である。また、この開放状態を画像処理によって自動的に計測することによって、あらかじめ予定した開放状態にフィードバック制御することもできる。

【 0 0 1 3 】

次に、図 2 を用いて、流路の開閉について説明する。図 2 a、b はそれぞれ、流路を適度に閉じて、溶液だけは流路 2 0 1 を通過するが、細胞 2 0 3 は通過させない状態での、水平断面と垂直断面図である。空気溜 2 0 2 に空気を導入して加圧することで、流路 2 0 4 は閉じ、その加圧の程度によって通過する細胞のサイズを調節することができる。

他方、図 2 c、d はそれぞれ、流路を開放して、溶液だけでなく細胞も流路 2 0 1 を通過する状態での、水平断面と垂直断面である。空気溜 2 0 2 から空気を排出することで、流路 2 0 4 は開き、その減圧の程度によって細胞をすべて通過させることができる。

【 0 0 1 4 】

図 3 は、実際に細胞培養マイクロチャンバーを製作するプロセスの一例を示すものである。まず、フォトリソグラフ技術等の微細加工技術によって鋳型を形成する（図 3 の 1）。たとえば、光硬化性肉厚レジスト材、S U - 8 を用いることで、ガラス基板 3 0 2 上に光学的に S U - 8 を硬化させた鋳型 3 0 1 を作成することができる。次に、鋳型の上に、光学的に透明で、かつ、弾性高分子を流し込みに硬化させることで、鋳型の形状を高分子に転写することができる（図 3 の 2）。ここで、たとえば光学的に可視領域で透明でかつ弾力性を持つ素材としては、シリコン樹脂（ポリジメチルシロキサン等）がある。高分子が硬化した後に、空気や溶液を流すための貫通穴を穿孔機を用いて作成し、鋳型から高分子をはがす

(図 3 の 3) 。最後に、この微細構造を転写した高分子をガラス基板 3 0 4 上に接着させ、空気圧調節部への接続コネクタや溶液の導入、排出部を取り付けることで細胞培養マイクロチャンバとして用いることができる。

【 0 0 1 5 】

図 4 は、実際に図 3 のプロセスで作成した光硬化性樹脂 S U - 8 を用いて作成した細胞培養マイクロチャンバーの鋳型 (図 4 a) と、この鋳型を転写して作成した高分子微細構造 (図 4 b) の一例である。この光学顕微鏡写真から、鋳型の微細構造を正確に高分子に転写することができることがわかる。

【 0 0 1 6 】

図 5 は、この細胞培養マイクロチャンバ中の流路の機能を示す一連の顕微鏡写真である。図 5 a では、空気溜に空気を加圧することで、流路を閉じ、細胞も溶液も流れないようにしたところである。図 5 b では、空気溜を陰圧で吸引することで、流路を細胞が流れない程度に開放したところである。この顕微鏡写真からもわかるように、溶液の流れによって細胞は流路まで引き寄せられるが、流路を通過することはできない。また、流路の開放量は光学顕微鏡によって目視で確認することができる。従って、細胞を実際に流さなくても、流路の開放値を目視のみで調節することができる。図 5 c は、更に流路を開放することで、細胞を流したところである。

【 0 0 1 7 】

図 6 には、更に実際に細胞が流路を通過する過程が顕微鏡写真で示されている。流路の左側にあった細胞 (矢印) は (図 6 の 1) 、流路を通過して (図 6 の 2) 、流路の右側に通過する (図 6 の 3) 。

【 0 0 1 8 】

【発明の効果】

本発明の細胞培養用マイクロチャンバーは以下のような特徴を持つ：

一細胞培養領域と外部とが流路によってのみ連結されるため、細胞が開閉装置などに接することがなく、細胞に余分な負荷がかからない。

一開閉手段が、流路の開閉の観察方向とほぼ直角であるため、観察が流路の開閉に影響されることが無く、また流路を通過又は通過しない細胞と、流路の開閉状

態とを同時に観察することができる。

これらの特徴により、細胞の培養液から単一細胞を分離することが可能になる。

そのため、従来不可能であった、泳動する生物細胞等を容器内の細胞数を制御しながら培養することが可能となる。また、容器の内部の細胞を選択的に回収することが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明の基本構成の一例を示す模式図である。

【図 2】

流路の開閉プロセスの一例を説明した模式図である。

【図 3】

培養マイクロチャンバー加工プロセスの一例を説明した顕微鏡写真を示す図である。

【図 4】

培養マイクロチャンバー加工プロセスで用いた鋳型と高分子培養マイクロチャンバーの一例を説明した顕微鏡写真を示す図である。

【図 5】

培養マイクロチャンバーの流路の開閉状態の例を示す顕微鏡写真を示す図である。

【図 6】

培養マイクロチャンバーの流路が開状態で細胞が流路を通過する場合の顕微鏡写真を示す図である。矢印は細胞を示す。

【符号の説明】

1 0 1、1 0 2 空気圧制御部との接続ジョイント

1 0 3、1 0 4 空気の通路

1 0 5、1 0 6、2 0 2 空気溜

1 0 7 溶液（細胞を含む培養液）の流れ

1 0 8、1 0 9、1 1 1、2 0 1、2 0 4 流路

1 1 0 細胞培養領域

1 1 2、3 0 2、3 0 4 ガラス基板

1 1 3、3 0 3 高分子（シリコン系樹脂）

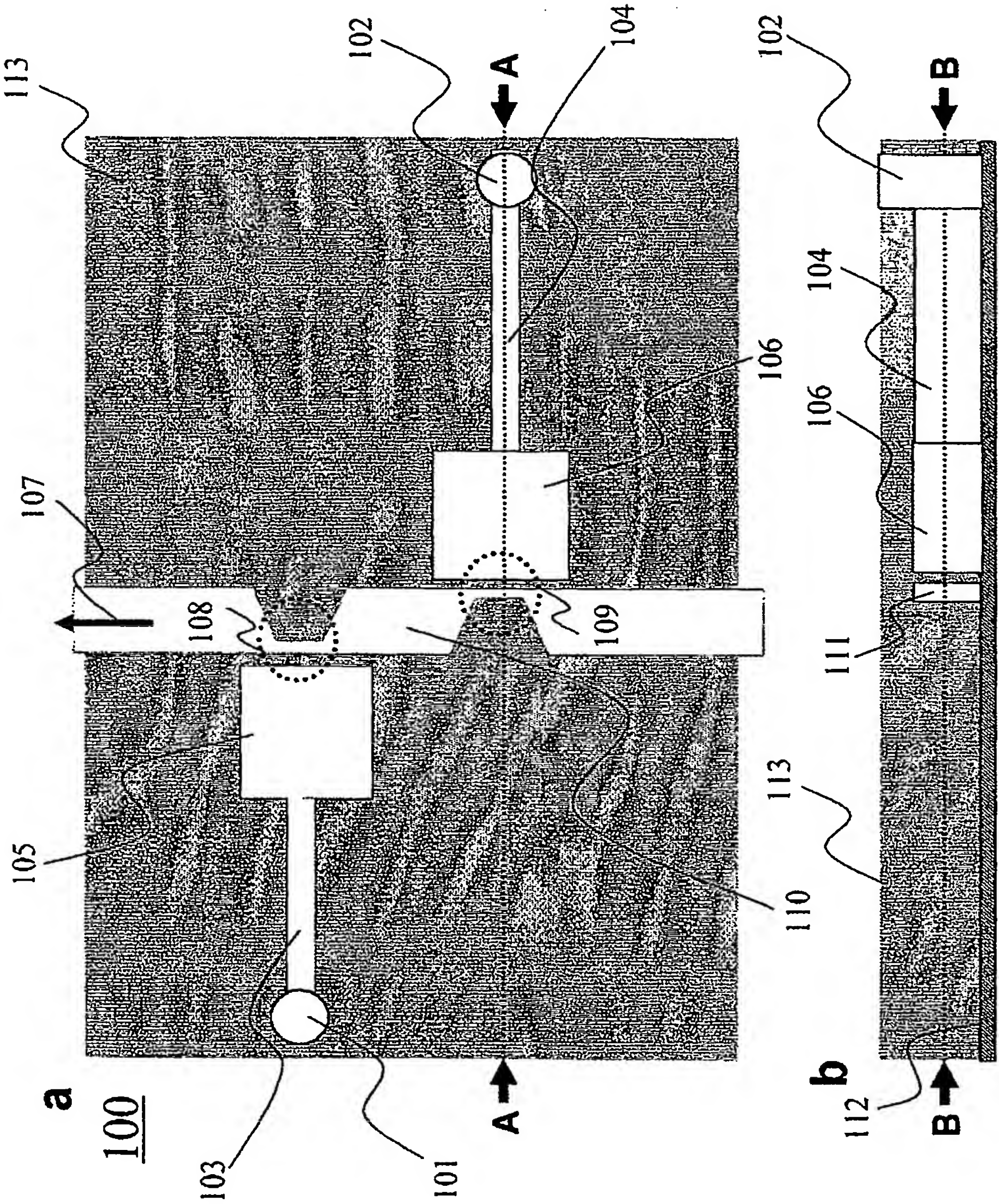
2 0 3 細胞

3 0 1 鋳型

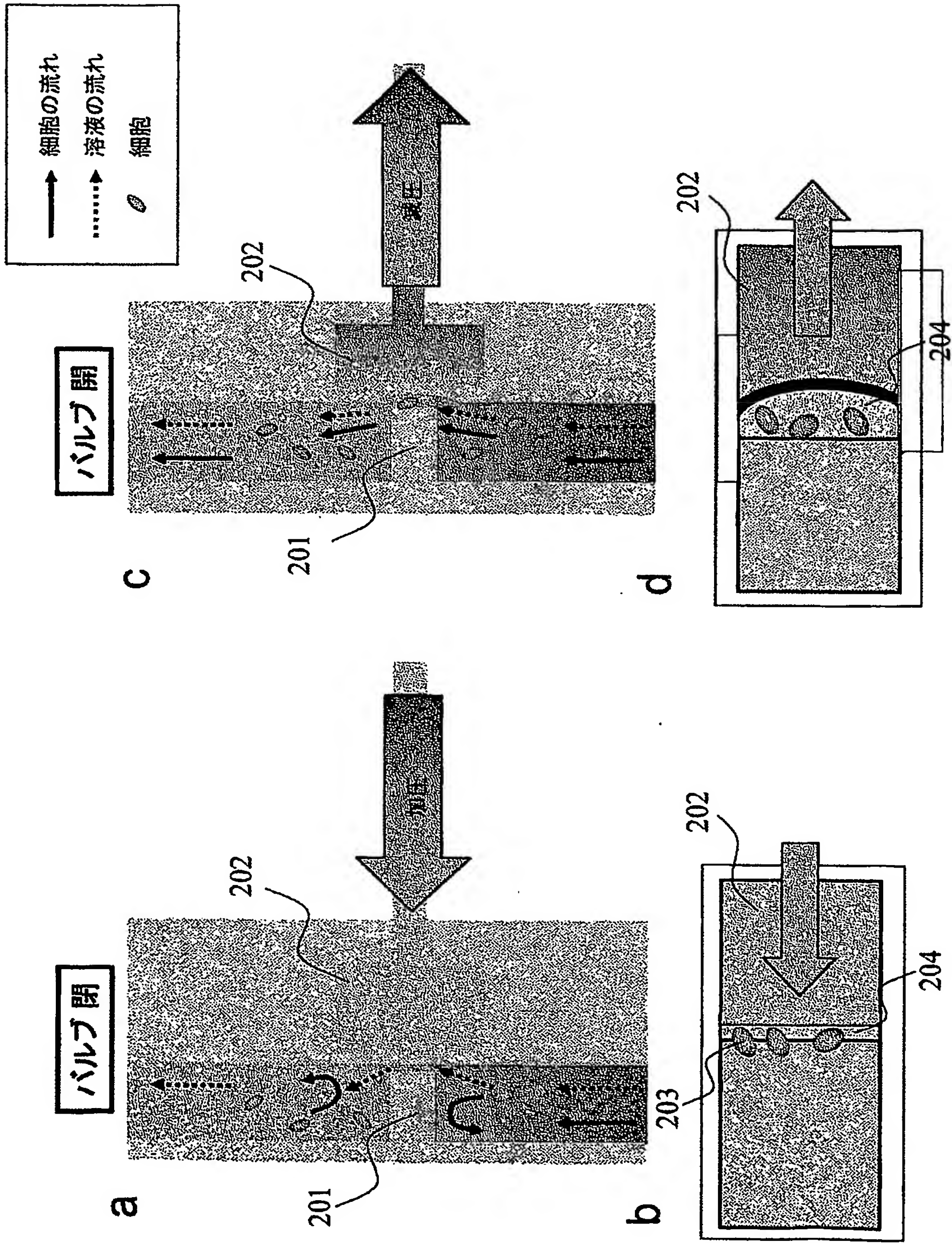
3 0 5 空気圧調節部への接続コネクタ

【書類名】 図面

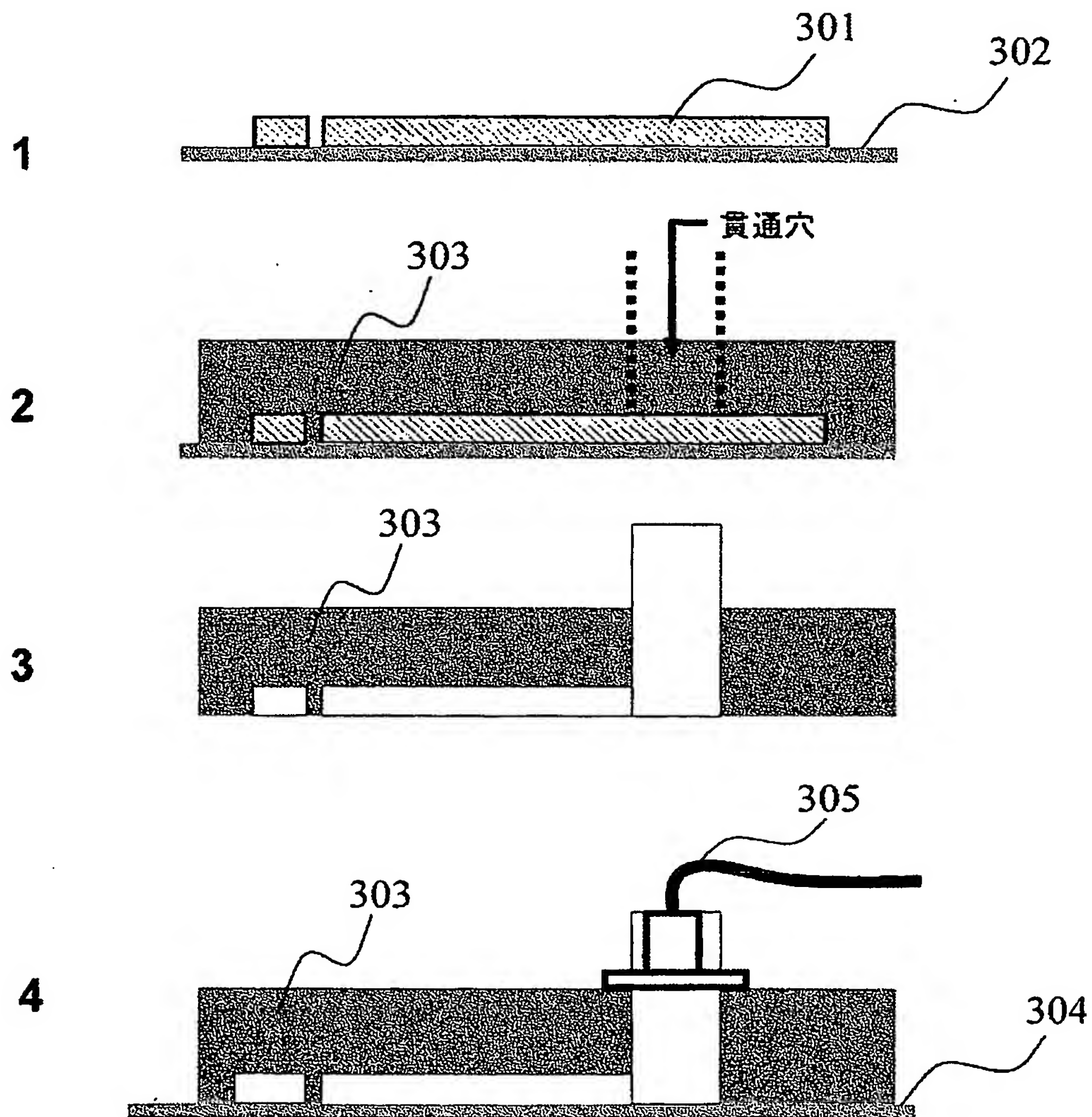
【図 1】



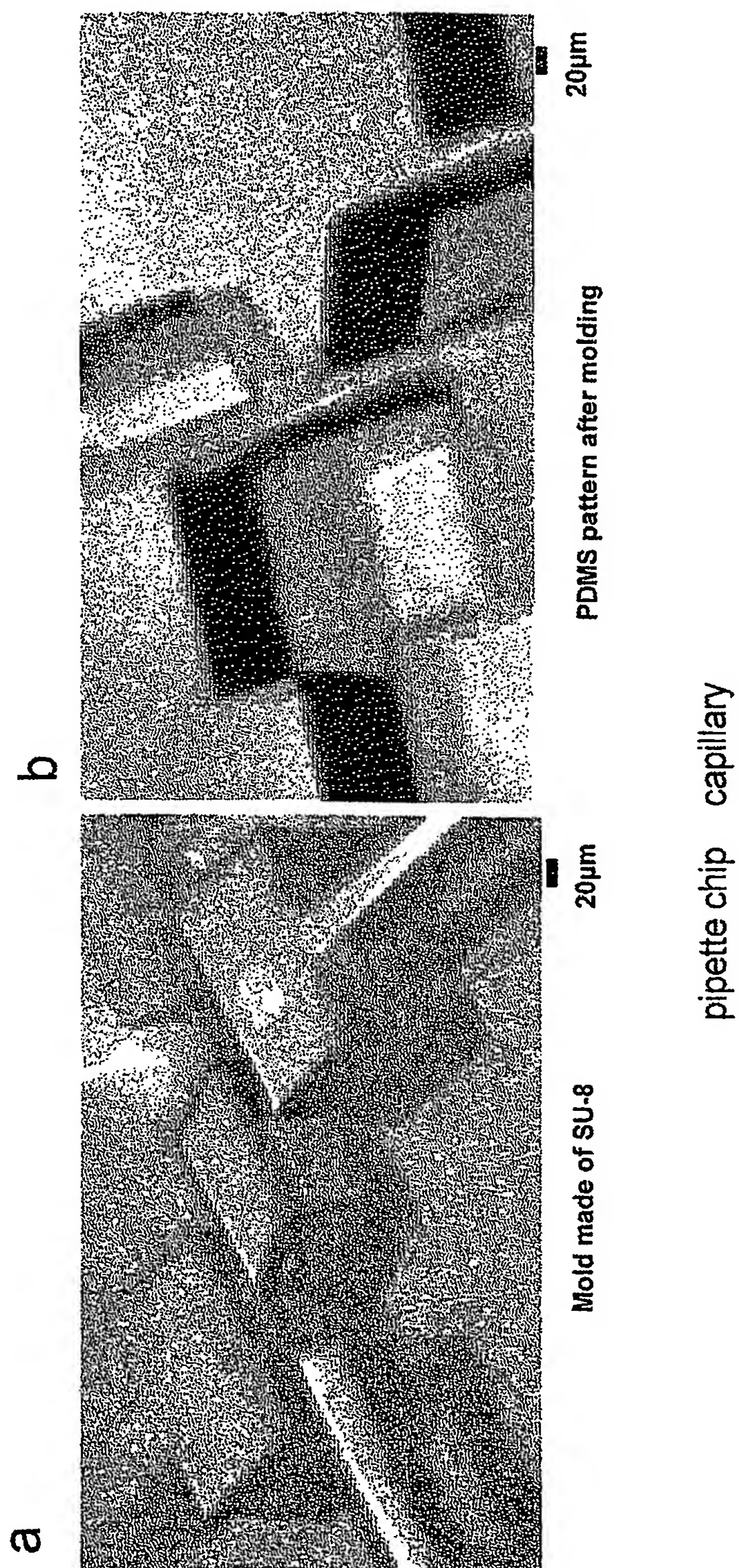
【図 2】



【図 3】



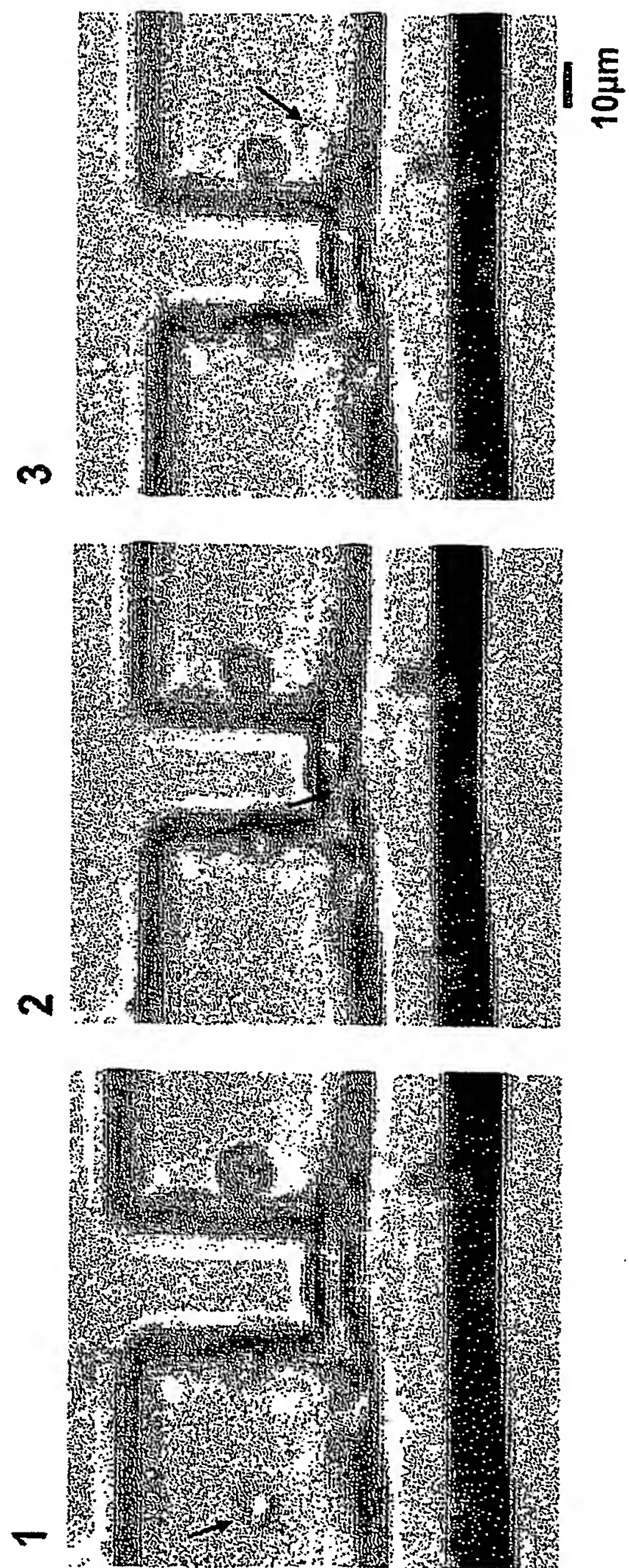
【図 4】



【図 5】



【図 6】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 培養中にマイクロチャンバーの形状を可逆に変化させることで、マイクロチャンバー内の泳動細胞を選択的に回収できる流路を開閉することのできる新しいマイクロチャンバーを提供する。

【解決手段】 スライドガラス等の光学的に透明な基板 1 1 2 上に、光学的に可視領域で透明で、かつ弾性高分子中に形成された細胞培養領域 1 1 0 と、その両端に位置する流路 1 0 8, 1 0 9 と、この開閉状況を膨張・収縮によって調節する空気溜 1 0 5, 1 0 6 と、この空気溜へ加圧、減圧を行うための空気の流路 1 0 3, 1 0 4 と、空気圧制御部との接続ジョイント 1 0 1、1 0 2 が配置されており、細胞を含む培養液は流れ 1 0 7 の方向に連続的に流れることができる。

【選択図】 図 1

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 3 - 1 3 9 7 7 3
受付番号	5 0 3 0 0 8 2 2 6 6 4
書類名	特許願
担当官	第八担当上席 0 0 9 7
作成日	平成 1 5 年 5 月 2 0 日

<認定情報・付加情報>
【提出日】 平成15年 5月19日

【書類名】 出願人名義変更届 (一般承継)
【提出日】 平成15年10月31日
【あて先】 特許庁長官 殿
【事件の表示】
 【出願番号】 特願2003-139773
【承継人】
 【識別番号】 503360115
 【住所又は居所】 埼玉県川口市本町四丁目 1 番 8 号
 【氏名又は名称】 独立行政法人科学技術振興機構
 【代表者】 沖村 憲樹
 【連絡先】 〒1 0 2 - 8 6 6 6 東京都千代田区四番町 5 - 3 独立行政法
人科学技術振興機構 知的財産戦略室 佐々木吉正 TEL 0
3 - 5 2 1 4 - 8 4 8 6 FAX 0 3 - 5 2 1 4 - 8 4 1 7
【提出物件の目録】
 【物件名】 権利の承継を証明する書面 1
 【援用の表示】 平成1 5 年 1 0 月 3 1 日付提出の特第許 3 4 6 9 1 5 6 号にかか
る一般承継による移転登録申請書に添付のものを援用する。
 【物件名】 登記簿謄本 1
 【援用の表示】 平成1 5 年 1 0 月 3 1 日付提出の特第許 3 4 6 9 1 5 6 号にかか
る一般承継による移転登録申請書に添付のものを援用する。

特願 2 0 0 3 - 1 3 9 7 7 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [3 9 6 0 2 0 8 0 0]

1. 変更年月日	1 9 9 8 年 2 月 2 4 日
[変更理由]	名称変更
住 所	埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号
氏 名	科学技術振興事業団

特願 2 0 0 3 - 1 3 9 7 7 3

- 出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [5 0 3 3 6 0 1 1 5]

1. 変更年月日	2 0 0 3 年 1 0 月 1 日
[変更理由]	新規登録
住 所	埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号
氏 名	独立行政法人 科学技術振興機構